

氏 名（本籍）	小池 裕（神奈川県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	乙第 444 号
学位授与年月日	令和 5 年 8 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	牛乳中の細菌性毒素の分析法開発と実態調査
論文審査委員	（主査）吉 岡 亘 （副査）上 家 潤 一 森 田 幸 雄

論 文 内 容 の 要 旨

牛乳は古くから高栄養食品として人々の健康を支えてきた。しかしながら、牛乳は動物由来食品であるため、細菌性毒素の汚染を完全に防除することができず、セレウス菌が産生するセレウリド（CRL）や黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシン A（SEA）が牛乳に残留したことで、大規模な集団食中毒事件が発生してきた。CRL と SEA を同定かつ定量する個別試験法にはそれぞれの課題があり、改良が必要であった。特に、鑑別が必要な 2 つの細菌性毒素を測定できる信頼性の高い分析法が求められていた。本研究の目的は、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いて、牛乳中 CRL と SEA を同一の条件で連続して測定し、再現性高く定量するとともに、簡単かつシンプルな前処理法を構築することとした。

LC-MS/MS による牛乳中の CRL の同定および定量法を開発した。酸性化によるタンパク質沈殿法によって牛乳中の CRL を濃縮し、アセトニトリルによる 2 回の抽出で回収した。これらの組み合わせにより、牛乳から夾雑成分を除去し、固相精製を用いたクリーンアップステップを省略した。さらに、再現性の良い測定と検出器を清浄に保つために、抽出溶液をメタノールで 10 倍に希釈した。その結果、フラグメンテーションへの干渉を最小限に抑え、プロダクトイオンスペクトルによる CRL の同定が可能となった。加えて、夾雑成分の影響を 4% とすることで、より簡便な外部標準検量線を採用し、正確な定量値を得た。開発した本法について、牛乳を対象試料に妥当性評価を行った。CRL を 2 濃度（10、50 ng/g）で添加し、1 試験者が 1 日 3 併行 5 日間の回収試験を実施した。その結果、本法は十分な選択性を有しており、真度 91-94%、併行精度 2-5%、室内精度 5-6%であった。定量下限値（LOQ）は 2 ng/g に設定できた。各パラメータは農薬等の試験法開発に使用される厚生労働省ガイドライン基準に適合し、本法が試験検査に適応できる分析性能を有していることを確認した。さらに、LOQ のプロダ

クトイオンスペクトルにおいて、標準品との一致率は 70%以上であり、LOQ まで確実かつ精確に同定・定量する本法の有用性を確認した。本研究は再現性の高い CRL スクリーニング法を開発し、従来の個別法と併用することで真度の検証といった運用を提案した。

(Koike, H., et al. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 35:2424-2433, 2018)

SEA の安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として用い、LC-MS/MS により牛乳中の SEA 定量法を開発した。本研究ではトリプシン消化した SEA 由来ペプチドを測定することで、牛乳中の SEA を確実かつ精確に同定・定量する。まず、SEA 由来ペプチドを 3 つ選定し、SEA 全体の 10%以上のアミノ酸配列を網羅することで、LC-MS/MS を使用して未知タンパク質を同定するための基準を満たす同定性能を確保した。次に、CRL と同じ LC 条件の適用を検証した結果、これらペプチドを十分に分離できることから、2 つの細菌性毒素を効率よく迅速に鑑別できることとなった。前処理では、牛乳中の SEA を pH 調整とトリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿法の 2 段階のプロセスで採集した。pH 調整によってカゼインを取り除き、SEA を選択的に濃縮した。TCA 沈殿法では、特別な器具を使用せずに SEA と他のタンパク質を分別した。また、酵素とタンパク質の比率を最適化することで、トリプシン消化効率を最大かつ安定化した。さらに、脱塩操作によって、分離を阻害する夾雑成分を取り除き、SEA 由来ペプチドの保持時間を保証し再現性を高めた。開発した本法について、牛乳を対象試料に妥当性評価を行った。SEA を 2 濃度 (50、100 ng/g) で添加し、1 試験者が 1 日 3 併行 5 日間の回収試験を実施したところ、十分な選択性を有しており、真度 80-82%、併行精度 13-14%、室内精度 13-18%であった。定量下限値は 10 ng/g に設定できた。各パラメータは農薬等の試験法開発に使用される厚生労働省ガイドライン基準に適合し、本法が試験検査に適応できる分析性能を有していることを確認した。本研究は LC-MS/MS によるペプチド測定に特化した前処理法を開発することで、先行研究よりも高精度かつガイドライン基準を満たす信頼性の高い SEA 定量法を確立した。

(Koike, H., et al. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 36:1098-1108, 2019)

開発した分析法を生乳に応用するため、生乳の代替となる特別牛乳を用いて添加回収試験を実施した。CRL 10 ng/g を添加した結果 (n=3) では、回収率 81.1%、RSD1.6%であった。SEA 50 ng/g を添加した試験 (n=3) では、回収率および RSD はそれぞれ 78.8%および 9.1%であった。本法の妥当性を検証した結果、十分な結果が得られた。さらに、CRL および SEA の実残留量の調査を実施した。東京都内で採取または購入した生乳 14 検体および低温殺菌牛乳 8 検体に本法を適用した。いずれの試料からも対象毒素である CRL と SEA を検出しなかった。

以上のことから、本研究は CRL と SEA の 2 つの細菌毒素を同一の LC-MS/MS 条件で連続して測定できる分析法を開発した。また、簡便な前処理法による精確かつ再現性の高い定量が可能となった。開発した本法を東京都内の実態調査に適用し、流通する牛乳類に定量下限値以上の CRL と SEA の残留がないことを確認した。開発した本法が食中毒の病因物質の同定や健康被害の防止に寄与するとと

もに、本研究が牛乳の品質保証や食品衛生における検査体制の強化に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

牛乳は日本を含む諸国において主要な畜産物である。このことから、牛乳の衛生管理は食の安全のために重要な課題となっている。衛生管理上の優先度が高い問題は細菌汚染であり、細菌性毒素の分析法に関して高い信頼性と感度が求められていた。このような状況から、本論文の研究では、牛乳中の細菌性毒素としてセレウス菌毒素セレウリド (CRL) と黄色ブドウ球菌毒素 (SEA) について食品衛生の実務で利用できる信頼性の高い分析法を開発した。

論文は4章から構成されている。第1章では、研究の背景について述べた上で、達成すべき課題を設定した。第2章では、牛乳中 CRL の分析法を開発した。酸性条件での沈殿とアセトニトリルでの2回抽出を組合わせた前処理を実施した後に液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて検出する方法を確立した。開発した方法の妥当性および性能に関して、真度 91-94%、併行精度 2-5%、室内精度 5-6%、定量下限値 2 ng/g であった。第3章では、タンパク質毒素である SEA の定量について、pH 調整とトリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿法を用いた前処理と、トリプシン消化された SEA 由来ペプチドの LC-MS/MS による分析方法を開発した。真度 80-82%、併行精度 13-14%、室内精度 13-18%、定量下限値は 10 ng/g であった。本研究の前処理方法は酸性化処理までは CRL と SEA で共通であり、さらに SEA の LC 条件を CRL と共通化することで、同一試料中の両毒素の分析に実用的利点を持たせた。CRL と SEA の分析は関連する試験法開発ガイドラインの基準に適合した。第4章では、生乳にも適用できることを無殺菌の特別牛乳を利用して示した。また、生乳と牛乳を対象とした CRL と SEA の実態調査を実施した。

本研究の成果は、生乳および牛乳に含まれる CRL と SEA を高い信頼性と感度で簡便に定量できる分析法を開発したことである。この分析法は食品衛生の実務に使用できる価値の高いものである。

本研究の一部は、以下の学術論文に公表済みである。

1. Koike, H., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Ohba, Y., Nakagawa, Y., Nagano, C., Sekimura, K., Hirai, A., Shindo, T., Kamiie, J., Sasamoto, T., Hashimoto, T.: Identification and quantification of cereulide in cow's milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 35:2424-2433, 2018.
2. Koike, H., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Ohba, Y., Nakagawa, Y., Nagano, C., Sekimura,

K., Hirai, A., Shindo, T., Otsuka, K., Kamiie, J., Sasamoto, T., Hashimoto, T.: Quantification of staphylococcal enterotoxin type A in cow's milk by using a stable isotope-labelled peptide via liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 36:1098-1108, 2019.

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、牛乳の食品衛生上問題となる細菌性毒素 CRL と SEA について、信頼性の高い定量法を開発することを目的として研究を実施した。この研究には両毒素の同一試料からの分析手法開発と開発した分析手法の生乳への適用が課題として含められた。これらの目的と課題は、牛乳の生産から流通までについて細菌性毒素の問題を解決するという目標に基づいて定められた。このように、本研究は、明確に設定されたテーマに基づき整理された課題と目的を持つものである。

2) 研究の背景

牛乳には原料由来の細菌に起因する食中毒の危険性がある。牛乳による食中毒の主な病因物質としてセレウス菌の産生するセレウリド (CRL) と黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシン A (SEA) がある。CRL と SEA は耐熱性毒素であり、菌体死滅後に残存して食中毒を起こし得る。従って、毒素そのものを検出対象とする必要がある。これらの毒素を対象とする従来の分析法は食品衛生の実務に用いられるものであっても再現性と感度が充分でないという報告があった。一方で、精度と感度の高い分析化学的定量法が存在したがランニングコストが高く日常業務にそのまま適用することは現実的でなかった。このような状況を解決することを目標とした本研究は、現状を分析して解決すべき問題を適切に捉えたものと評価できる。

3) 研究の方法

高感度かつ精密な定量が必要であること、分析対象の性状に適していることから、定量には LC-MS/MS が用いられた。その上で、測定系全体の簡便性と信頼性を確保するために、前処理法について詳細な検討を実施した。開発した分析法の信頼性を検証するために、妥当性評価試験によって真度・併行精度・室内精度を求めて関連のガイドラインへの適合性を確認することとされた。このように、目的達成に適う方法が選択されている。

4) 研究の結果

牛乳中 CRL について、酸性化による沈殿とアセトニトリル 2 回抽出とメタノール希釈を組合わせた前処理を経て LC-MS/MS により同定・定量する方法を開発し、真度 91-94%、併行精度 2-5%、室内精度、定量下限値 2 ng/g と、高い信頼性と感度を持つことを示した。SEA について、酸性化処理した上清の TCA 沈殿とトリプシン消化と脱塩精製を組合わせた前処理方法を経て LC-MS/MS により同定・定量する方法を開発し、真度 80-82%、併行精度 13-14%、室内精度 13-18%、定量下限値 10 ng/g と十分な性能を持つことを示した。

開発した方法の実用性が確かめられた。具体的には、生乳に適用できることを特別牛乳を利用して明らかにした。また、同一乳試料中の CRL と SEA の分析結果が干渉しないことを確認した。さらに、添加回収試験により内部品質管理を行いながら生乳・牛乳中の CRL と SEA の実態調査が実施できることを示した。

本研究は、信頼性と再現性を定量的に評価することによって、明確な結果を提示している。また、分析方法を開発することにとどまらず、実用性があることを明らかにしている。これらのことから質・量ともに優れた結果を含む研究と判断した。

5) 考察と結論

本研究は、主な結果から得られる結論を支える種々の分析を実施している。分析対象を牛乳に添加して得た検量線と標準溶液の検量線を比較することによる牛乳成分による測定への干渉の分析、CRL および SEA の単独または同時添加の比較、選択性に関する様々な分析等々がこれに該当する。研究内のデータ群に基づく考察が結論を強固に支える研究となっている。また、類法や先行研究を適切に引いて結果の比較および分析をおこなっている。さらに、妥当性評価の指標は各指標は適切なガイドラインを参照して結論を下している。これらの考察と結論は、論理的に著述されている。

6) 参考論文

必要な参考文献が、必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑応答に対する的確な回答から、食品衛生学と食品衛生検査業務に関する十分な理解ならびに分析化学に関する専門知識を有することが認められた。また、本研究は獣医学および公衆衛生学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。